



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 15/10	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/35492 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. December 1995 (28.12.95)
---	----	---

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/02344	(81) Bestimmungsstaaten: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ, UG).
(22) Internationales Anmeldedatum: 16. Juni 1995 (16.06.95)	
(30) Prioritätsdaten: P 44 22 313.7 17. Juni 1994 (17.06.94) DE P 44 22 290.4 25. Juni 1994 (25.06.94) DE	
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH [DE/DE]; Grandweg 64, D-22529 Hamburg (DE).	Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): EIGEN, Manfred [DE/DE]; Georg-Dehio-Weg 14, D-37075 Göttingen (DE). RIGLER, Rudolf [DE/SE]; Handelsvägen 24, S-18 236 Dandöryd (SE). HENCO, Karsten [DE/DE]; Kirchberg 4, D-40699 Erkrath (DE).	
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Deichmannhaus am Hauptbahnhof, D-50667 Köln (DE).	

(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR SELECTIVELY EXTRACTING COMPONENTS FROM COMPLEX MIXTURES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR GEZIELTEN ENTNAHME VON KOMPONENTEN AUS KOMPLEXEN MISCHUNGEN

(57) Abstract

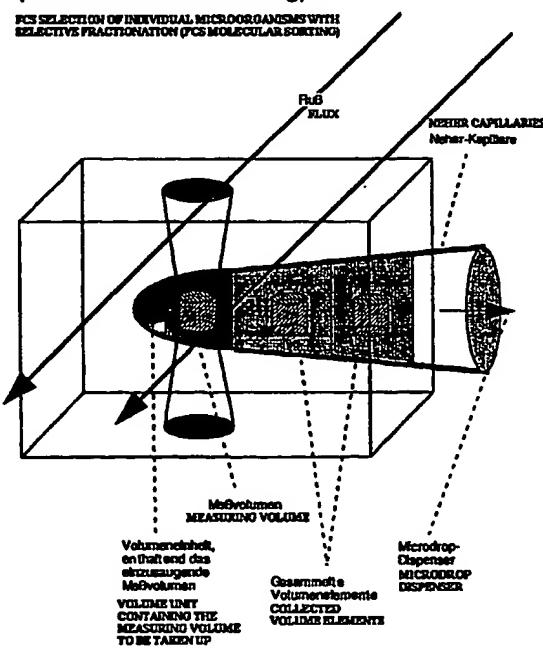
The process of the invention facilitates the selective extraction of one or a few molecularly dispersed or cellular components of a system, like molecules, molecule complexes, vesicles, micells, cells, possibly with a relevant volume element V of size $10^{-9} \text{ l} \geq 10^{-18} \text{ l}$, from a larger sample volume. The required component is selectively transferred to another environment by setting the place and time of the extraction by means of a signal correlating the small component to be extracted. The process is particularly suitable for the extraction of rare components, the existence of which can be detected in a previous stage by means of a scanning process. The process is also suitable for the extraction of unidentified components.

(57) Zusammenfassung

Das erfundungsgemäße Verfahren erlaubt eine gezielte Entnahme von einem oder wenigen molekulardispersen oder zellulären Bestandteilen eines Systems wie Moleküle, Molekülkomplexe, Vesikel, Micellen, Zellen, gegebenenfalls mit einem dazugehörigen Volumenelement V der Größe $10^{-9} \text{ l} \geq V \geq 10^{-18} \text{ l}$ aus einem größeren Probevolumen. Der gezielte Transfer des gesuchten Bestandteiles in eine andere Umgebung geschieht durch Festlegung von Ort und Zeit der Entnahme durch ein mit dem zu entnehmenden kleinen Bestandteil korrelierendem Signal. Das Verfahren ist besonders geeignet zur Entnahme selten vorkommender Bestandteile, die in einem vorgelagerten Schritt durch ein Scanverfahren in ihrer Existenz nachgewiesen werden können. Das Verfahren eignet sich auch zur Entnahme an sich nicht identifizierter Bestandteile.

FCS-Selection einzelner Mikroorganismen
mit gezielter Fraktionierung
(FCS-Molekül-Sortierung)

FCS SELECTION OF INDIVIDUAL MICROORGANISMS WITH
SELECTIVE FRACTIONATION (FCS MOLECULAR SORTING)



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Oesterreich	GA	Gabon	MR	Mauritanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**Verfahren und Vorrichtung zur gezielten Entnahme
von Komponenten aus komplexen Mischungen**

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Entnahme von einem oder wenigen Bestandteilen eines Systems, eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens und dessen Anwendungen.

Die funktionale Charakterisierung einzelner Moleküle oder Molekülkomplexe, Viren oder einzelner Zellen wird mit Hilfe der in Rigler et al. (PCT/EP 94/00117) beschriebenen Verfahren möglich. Es lassen sich mit dem beschriebenen Verfahren Aussagen darüber erhalten, ob in einem komplexen Gemisch einer Lösung oder Suspension oder in einer zweidimensionalen Schicht einzelne Moleküle oder Molekülkomplexe in sehr kleinen Volumenelementen ($< 10^{-12}$ l) enthalten sind, die bestimmte Wechselwirkungen mit definierten Zielmolekülen eingehen.

Für viele analytische und synthetische Fragestellungen ist es bereits von großem Vorteil zu wissen, daß sich ein gesuchtes Molekül in einer analysierten Mischung befindet. Häufig stellt sich jedoch erfindungsgemäß zu lösende Aufgabe, das einmal als gewünscht erkannte Molekül gezielt aus dem Gemisch zu entfernen im Sinne einer präparativen An-

- 2 -

reicherung, um z.B. Klonierungsschritte zu umgehen oder vereinfachen zu können. Eine weitere Aufgabe besteht bei besonders verdünnten Lösungen einer Konzentration von 10^{-12} M in einem raschen Auffinden eines Volumenelementes als Teil des Probevolumens, in dem sich ein Vertreter der gesuchten Substanz befindet. Die gesuchte Substanz muß dabei keinesfalls bekannt sein. Bei der Suche nach unbekannten Pathogenen oder Wirkstoffen sind eventuell nur Wechselwirkungen zu bekannten Substanzen bekannt, oder es können Wechselwirkungen zu eventuell anwesenden Nachweismolekülen postuliert werden.

Zur Entnahme ganzer Zellen sind Verfahren und Vorrichtungen beschrieben. Die entsprechenden Vorrichtungen sind als Zell-Sorter bekannt. Es lassen sich aufgrund bestimmter Parameter der Lichtstreuung oder Fluoreszenz z. B. bestimmte Zell-Typen eines Blutbildes identifizieren und die Zellen einer definierten Spezifikation auszählen. Die Zellen lassen sich mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern anfärben und aufgrund ihrer Oberflächen-Antigene differenzieren oder über Hybridisierungsverfahren (in situ) über ihren Nukleinsäuregehalt klassifizieren. Nach einer Vereinzelung in Tröpfchen werden die Zellen im Durchfluß analysiert und können durch gezielte elektrostatische Ablenkung einzelner Tropfen selektiv ausgesondert bzw. fraktioniert werden. Entsprechende Geräte werden kommerziell angeboten und sind für klinische Diagnostik und Forschung von großer Bedeutung. PCT/EP 93/03077 offenbart, wie aus einem kapillaren Fluß einzelne, linear getrennte Volumenelemente separiert werden können.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, das es ermöglicht, aus einem größeren Volumenelement eines Probenvolumens einer Lösung oder Suspension an definierten Raumkoordinaten, ein kleines Volumenelement der Lösung oder Suspension zu entnehmen, wobei dieses Volumenelement eine Zielsubstanz enthält. Ein solches kleines Volumenelement kann durch Einsatz von Analyse-

- 3 -

verfahren definiert werden, wie sie in der Anmeldung Rigler et al. (PCT/EP 94/00117) beschrieben sind. Hierbei werden äußerst kleine Meßvolumina als Teil eines größeren, umgebenden Probevolumens analysiert, indem durch konfokale Ausleuchtung eines Volumenelementes, Anregung durch das zur Ausleuchtung verwendeten Lichts und/oder Registrierung spezifischer Fluoreszenzsignale auf die Anwesenheit bestimmter Inhaltsstoffe geschlossen wird. Die Ausleuchtung kann alternativ z.B. auch durch die Methode der Nahfeldspektroskopie geschehen, wobei Blenden mit Öffnungen verwendet werden, die kleiner sind als die Wellenlänge der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung. Es soll die auch Aufgabe gelöst werden, aufgrund der spektralen Eigenschaften einer gesuchten, nachgewiesenen Substanz, ein bestimmtes Molekül, ein Molekülkomplex oder eine Zelle, diese gezielt zu entnehmen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in besonders vorteilhafter weise zum Nachweis bislang nicht identifizierter unbekannter Pathogene oder Immunogene eingesetzt werden. (unbekannter) Pathogene oder Immunogene können charakterisiert und gegebenenfalls präparativ dargestellt werden. Eine besonders vorteilhafte Vorgehensweise im Sinne der Erfindung nutzt die Tatsache, daß Pathogene sich nach erfolgter Infektion eines Wirtsorganismus zunächst vermehren, ohne durch eine präsente Immunabwehr daran gehindert zu werden. Erst nach Ablauf einer bestimmten Periode etabliert die Immunabwehr eine humorale Immunantwort z. B. durch die Synthese verschiedener Immunglobuline (vornehmlich IgM, gefolgt von IgG) und später eine zelluläre Immunantwort. Patienten mit Verdacht auf eine erfolgte Infektion oder auf Kontakt mit einem bisher unbekannten Pathogen oder Immunogen ohne Detektierbarkeit bekannter Antigen-Eigenschaften bezüglich einer Reaktion und Detektierbarkeit mit bekannten Antiseren/Antikörpern, stellen das Ausgangsmaterial für die Pathogenisierung dar. Zu einem späteren Zeitpunkt, in der Phase des chronischen Erkrankungsstadiums, wird davon ausgegangen, daß

- 4 -

sich inzwischen Antikörper gegen das vermeintliche Pathogen, z.B. ein Virus, gebildet haben, der Virustiter dadurch allerdings inzwischen stark erniedrigt ist. Seren aus diesem Erkrankungsstadium dienen zur Präparation der Immunglobuline.

Die Fraktion der Immunglobuline enthält im Normalfall nur zu einem untergeordneten Prozentsatz Antikörper, die gegen das unbekannte Pathogen gerichtet sind. Die Mehrzahl der Antikörper richtet sich gegen eine Vielzahl von nicht mit dem gesuchten spezifischen Pathogen/Immunogen im Zusammenhang stehenden Antigenstrukturen. Deshalb ist es schwieriger, das Pathogen über den Immunkomplex durch Verwendung von Seren eines einzigen Patienten zu charakterisieren.

Der gesuchte Immunkomplex läßt sich jedoch durch Hinzuziehung einiger erwarteter Charakteristika isolieren:

- Der Immunkomplex enthält den massenmäßig bestimmenden Hauptanteil eines Pathogens, dessen Beweglichkeit zwischen der eines kleinen RNA Virus und der eines Bakteriums liegt.
- Das Pathogen hat mehrere antigene Bindestellen, die mit mehr als einem Farbstoff-markierten Antikörper besetzt sind.

In einer bevorzugten Vorgehensweise lassen sich (Figur 5) die Antikörper aus zwei Patienten im Zustand der hypothetisch chronischen Phase getrennt präparieren und mit unterschiedlichen oder über Kreuzkorrelation unterscheidbaren Farbstoffen markieren. Es werden dabei die mindestens zwei Patienten danach ausgewählt, daß eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, daß beide Patienten sich mit demselben Pathogen infiziert haben. Da Pathogene in der Regel eine große Anzahl der antigenen Determinante auf der Oberfläche/Virushülle tragen, ist es wahrscheinlich, daß die gebildeten Immunkomplexe nach der Reaktion mit einem Gemisch der unterschiedlich

- 5 -

markierten Antiseren gleichzeitig die verschiedenen, markierenden Farbstoffe aufweisen.

Experimentell wird vorgegangen, wie es in Figur 5 dargestellt ist.

Detektion einzelner Bakterien über die Bindungsspezifitäten von oberflächen-exprimierenden Bakterien

Für eine große Anzahl wichtiger Anwendungen der modernen biotechnologischen Forschung wäre es äußerst vorteilhaft und effizient, könnte in einem Verfahren anstelle der Detektion eines funktionalen Biomoleküls in einem gegebenen Probenvolumen die Detektion eines einzelnen Bakteriums oder eines Virus mit funktionalen Oberflächenproteinen erfolgen. Der entscheidende Vorteil liegt in der interessanten Kopplung eines phänotypischen Expressionsproduktes, z.B. eines natürlichen oder eines rekombinanten Oberflächenproteins an dessen genetischen Bauplan. Das Verfahren ist insbesondere im Zusammenhang mit einem erfindungsgemäßen präparativen Einsatz zu sehen, durch den als gewünscht bestimmte Zellen oder Molekülkomplexe aus einer Umgebung ausgesondert werden können.

Bestimmung und präparative Gewinnung der immunogenen Epitope von Mikroorganismen

Das Genom von Mikroorganismen umfaßt ca. 10^7 Nukleotide. Durch Shotgun-Expression lassen sich mit dem beschriebenen Verfahren subgenische Fragmente einer durchschnittlichen Länge von 100 Aminosäuren exprimieren. Unter Berücksichtigung der Leserahmenvariation (Faktor 3) und eines angenommenen nicht kodierenden Gegenstranges enthalten 10^8 rekombinante Bakterienklone jedes Segment ca. 100fach. 10^8 rekombinante Bakterienklone sind in 1 ml einer Suspension von 1 OD enthalten, die sich in ca. 24 Stunden mit dem erfindungsgemäßen Verfahren einzeln z.B. auf ihre Binde-

- 6 -

eigenschaften mit IgE oder IgE tragenden Zellen aus einem Allergie-Patienten untersuchen lassen. Erfindungsgemäß werden die entsprechend charakterisierten Bakterien ausgesondert, zumindest jedoch stark angereichert, biologisch expandiert oder das entsprechende Genomsegment durch enzymatische Amplifikationsverfahren amplifiziert und charakterisiert.

Falls ein entsprechendes Bakterium im Meßvolumenelement detektiert wird, kann es erfindungsgemäß unmittelbar aus dem Gemisch entfernt werden, indem das Bakterium/Molekülkomplex umgebende Volumenelement durch eine Kapillare abgesogen wird oder der Molekülkomplex durch Elektrophorese, Elektroosmose oder Dipolinduktion abgetrennt wird (Figuren 1 und 2).

Ein der Erfindung zugrundeliegender Erfindungsgedanke ist, daß eine elektrisch, optisch oder mechanisch gesteuerte Absaugvorrichtung eingesetzt wird, deren Öffnungsdimension groß ist gegenüber dem Meßvolumen, aber klein gegenüber der Dimensionierung des Probevolumens, um das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem zu lösen. Erfindungsgemäß wird das elektrische, optische oder mechanische Pumpsystem durch einen FCS-gesteuerten Impulsgeber gesteuert, so daß ein kleiner Anteil des Probevolumens so von dem Gesamtvolume abgetrennt wird, daß eine Rückdiffusion weitgehend ausgeschlossen werden kann. Dies geschieht entweder durch Elektrophorese, induzierte Dipolmomente, Elektroosmose, mechanisch induzierte Drucksprünge oder durch Lichtdruck.

Das Verfahren erlaubt die Entnahme von einem oder wenigen Bestandteilen eines Systems wie Moleküle, Molekülkomplexe, Vesikel, Micellen, Zellen, gegebenenfalls eingebettet in einem dazugehörigen Volumenelement (Entnahmeverolumen) V ($10^{-9} \text{ l} \geq V \geq 10^{-18} \text{ l}$). Dieses Volumenelement ist Teil eines größeren Volumens einer Umgebung, die die zu entnehmenden kleinen Bestandteile enthält (Probevolumen). Die Entnahme erfolgt durch Transfer des Bestandteiles oder der Bestandteile in eine andere Umgebung, wobei Ort und Zeit der Ent-

- 7 -

nahme durch ein mit dem zu entnehmenden kleinen Bestandteil korrelierendes Signal einer Analyse festgelegt wird. Als Analyseverfahren kommen solche Verfahren in Frage, bei denen der molekulare Inhalt kleinster Volumenelemente (10^{-14} l) analysiert werden können, wie dies durch das in der internationalen Anmeldung Rigler et al. PCT/EP 94/00117 beschrieben ist. Das Probevolumen ist mit Aufnahmeverrichtung durch eine Pore einer Kapillare oder einer Pore einer Membranwandung verbunden, deren engste Öffnung D durch $100 \mu\text{m} \leq D \leq 0,1 \mu\text{m}$ gegeben ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird hierzu eine Kapillare eingesetzt, wie sie bei Neher et al., Methods in Enzymology, Vol. 207, 3 - 14 beschrieben ist. Diese Kapillare ist z.B. mit einer Fördereinrichtung, wie eine Pumpe verbunden, die in der Lage ist, das den Molekülkomplex umgebende Lösungsvolumen abzuziehen. Erfindungsgemäß bevorzugt ist der Einsatz eines mechanisch, lichtdruck- oder elektrisch gesteuerten Absaugsystems oder eines (Piezo-/Solenoid-) -pumpen gesteuerten Dispensersystems.

Es lassen sich mehrere Entnahmen in ein oder mehreren Schritten in ein und dieselbe Aufnahmeverrichtung durchführen, wobei die einzelnen Entnahmevergänge jeweils unabhängig voneinander im Sinne eines Sammelvorganges erfolgen können.

In vielen Fällen ist die elektrisch gesteuerte Entnahme über einen gerichteten Transport des Volumenelementes durch mindestens einen elektrischen Spannungs-oder Feldimpuls bevorzugt. Andere Ausführungsformen arbeiten mechanisch durch mindestens einen Druckdifferenzpuls und/oder durch mindestens einen Lichtdruckpuls, in Richtung auf die Porenöffnung mit Verfahren, wie sie z.B. von Weber und Greulich, Int. Rev. Cytol., 1992, 133, pp. 1 - 41, publiziert wurden. Die Aufnahmeverrichtung kann eine Kapillare sein, deren Lumen vorzugsweise größer ist als der Durchmesser der Pore oder

- 8 -

Kapillaren spitze, deren Öffnung mit dem Probevolumen in direktem Kontakt steht. In durchgängig dünnen Kapillaren kann Elektroosmose durchgeführt werden, wie es in der Kapillarelektrophorese üblich ist, bei mechanischem Volumentransport könnte ansonsten der Strömungswiderstand unvorteilhaft groß werden.

Im Falle einer elektrisch vermittelten Entnahme wird vorzugsweise der gewünschte Bestandteil im Meßvolumen gezielt über einen elektrischen Feldimpuls über das mindestens einmalige, kurzzeitige Anlegen eines elektrischen Feldes, zum Zweck einer Elektrophorese elektrisch geladener Bestandteile und/oder zum Zweck einer Elektroosmose mit gekoppeltem Transport elektrisch neutraler Moleküle, in die Aufnahmeverrichtung transferiert. Eine Elektrode kann dazu mit der Lösung auf Seiten des Probevolumens elektrisch leitend in Kontakt gebracht, die andere Elektrode auf Seiten der Aufnahmeverrichtung elektrisch leitend mit der Lösung in Kontakt gebracht und der leitende Kontakt zwischen beiden Kompartimenten über die Pore hergestellt werden. Bei der Entnahme über einen gezielten Druckpuls wird durch mindestens einmalige kurzzeitige Erhöhung des Druckes im Volumen außerhalb des Aufnahmekompartimentes im Vergleich zum Druck innerhalb des Aufnahmekompartimentes der gewünschte Transport bewirkt und/oder durch eine kurzzeitige Druckminderung innerhalb des Aufnahmekompartimentes. Hierbei haben sich an sich bekannte Dispenser (Microdrop) oder Pump/Saugvorrichtungen bewährt (Solenoid-Pumpen, Schrittmotor-gesteuerte Pumpen). Damit können kleine Volumenelemente von $\leq 1 \text{ nl}$ aus einem größeren Volumen einer Lösung oder Suspension durch Transfer des kleinen Volumenelementes durch eine Pore eines Durchmessers $\leq 100 \mu\text{m}$ in ein Aufnahmekompartiment transferiert werden, wobei der Zeitpunkt und die Raumkoordinate des Entnahmevergang über ein korreliertes Analysesystem wie durch die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) gesteuert wird.

- 9 -

Insbesondere durch einen Unterdruckpuls über ein piezogesteuertes Dispensiermodul, dessen Füllvolumen sich innerhalb des Aufnahmekompartimentes befindet und/oder durch einen Druckpuls und/oder Unterdruckpuls wird bewirkt, daß das Volumen der Aufnahmeverrichtung vergrößert wird oder das Probevolumen zugunsten der Aufnahmeverrichtung verkleinert wird. Erfindungsgemäß folgt der Transport in das Aufnahmeverum. Die Größe des aufgenommenen Volumens wird über die Anzahl der dispesierten Tropfen oder der Schrittmotorschritte oder über die Länge und Intensität des Lichtdruckpulses gesteuert.

Das Hardware-/Software-gekoppelte on line-arbeitende Analyse-system triggert über das aufgenommene, korrelierende Signal den Entnahmezeitpunkt. Die Entnahme erfolgt in dem Moment, wenn sich der oder die zu entnehmende Partikel mit hoher Wahrscheinlichkeit innerhalb des Entnahmeverumens befindet. Dies muß nicht unbedingt annähernd zeitgleich mit dem erhaltenen positiven Analyseergebnis erfolgen. Wenn ein Molekül, Molekülkomplex, Virus oder Zelle durch FCS als zu entnehmender Bestandteil identifiziert wurde, besteht die Möglichkeit der direkten Entnahme oder einer späteren Entnahme. Dabei wird die Annahme zugrundegelegt, daß der jeweilige zu entnehmende Bestandteil

- entweder kurz nach der erfolgten Messung durch erzwungenen Transport wie beschrieben oder elektrophoretische Wanderung sich zu einem definierten Zeitpunkt an einem bestimmten Ort aufhält und da gemäß Figuren 1 und 2 elektrophoretisch oder mechanisch präparativ abgetrennt werden kann, oder
- ohne erzwungene Translation sich noch in der Nähe des Detektionsverumens aufhält, aus dem der Bestandteil elektrophoretisch, optisch durch Lichtdruck oder mechanisch abgetrennt werden kann.

- 10 -

Handelsübliche Zellsortierer sind mit einem System zur Vereinzelung von Zellen nach vorheriger Analyse ausgestattet, das sich erfindungsgemäß mit dem analytischen Verfahren der Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie koppeln läßt. Üblicherweise werden Zellen in einem Flüssigkeit ummantelten, kapillaren Fluß durch eine Küvette geleitet, die mit einer konventionellen Fluoreszenzmessvorrichtung und/oder einer Lichtstreuemeßvorrichtung gekoppelt ist. Im definierten räumlichen und zeitlichen Abstand nach der Meßvorrichtung wird am Ende der Kapillare durch eine angelegte kontinuierliche Schallfrequenz für eine normierte und kontinuierliche Zerteilung des dünnen Flüssigkeitsstrahles in einzelne austretende Tröpfchen gesorgt. Im Falle, daß eine Zelle eines gewünschten Zelltyps die Küvette passiert, befindet sich diese Zelle nach einer definierten Zeit in einem dieser Tröpfchen, das nach der Vereinzelung durch ein gekoppeltes Signal z.B. mittels eines Puls im elektrostatischen Feld gezielt aus seiner Flugbahn abgelenkt werden kann und so in einer separaten Aufnahmeverrichtung abgetrennt werden kann. Der Nachteil der Methode liegt darin begründet, daß im strömenden Fluß nur ein integrales Fluoreszenzsignal im Sinne einer reinen Intensitätsmessung erhalten werden kann. Im Gegensatz dazu ermöglicht die erfindungsgemäße Kopplung mit der Methode der Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie in kleinen Volumenelementen, eine Differenzierung der erhaltenen Fluoreszenzsignale nach Zugehörigkeit zu unterschiedlichen Molekülgrößen und Molekülbeweglichkeiten. Dies ist erforderlich, um z.B. Rezeptorgebundene Liganden von anwesenden freien Liganden zu unterscheiden. Erfindungsgemäß wird die Methode der fluoreszenz-korrelations-spektroskopischen Nachweistechnik von fluoreszierenden Partikeln wie Molekülen, Vesikeln, Zellen oder Molekülkomplexen im mechanisch induzierten, kapillaren Fluß mit einer gezielten Sortievorrichtung durch eine Pore eingesetzt.

Der eigentliche Trennvorgang kann hierbei nach dem Durchtritt einzelner Volumenelemente durch die Pore stattfinden, indem

- 11 -

nach definierter räumlicher und zeitlicher Korrelation die positiv registrierten Meßvolumina mit einem zugehörigen Volumenelement in getrennte Aufnahmeverrichtungen überführt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann der FCS-Meßvorgang auch vor dem Austritt aus der Pore einer Kapillaren spitze erfolgen, die mit einer Mikrodispenservorrichtung gekoppelt ist und wobei durch verschiedene mechanische oder Feld-induzierte Ablenkungen kleine Meßvolumina mit einem zugehörigen Volumenelement der Umgebung als Tröpfchen in verschiedenen Aufnahmeverrichtungen aufgefangen werden.

Insbesondere erfolgt die zeitliche und/oder ortsspezifische Korrelation zwischen einer Analyse eines Subvolumens des Probevolumens (Meßvolumen) innerhalb des Volumenelementes V und einer Entnahme eines gewünschten Bestandteiles durch Entnahme des Volumenelementes V Hardware-/Software-gestützt. Sie wird vorgenommen, wobei sich mindestens ein Bestandteil, das im Volumenelement V positiv identifiziert wurde, beim Entnahmevergong im aufgenommenen Volumenelement V befindet. Dabei wird die Pore der Aufnahmeverrichtung mechanisch an das Volumenelement herangeführt und/oder das Volumenelement V oder Bestandteile davon mit vorbestimmter zeitlicher Korrelation über einen Transport im Fluß oder über elektrostatische oder magnetische Feldgradienten oder Bestandteile davon an die Pore des Aufnahmekompartimentes mit zeitlicher Korrelation transportiert. Die Analyse kann auch unmittelbar vor der Pore des Aufnahmekompartimentes erfolgen. Vorzugsweise ist das Subvolumen (Meßvolumen) kleiner als das Volumenelement V . Damit wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß der positiv identifizierte Bestandteil entnommen wird, bevor er sich zu weit aus seinem Meßvolumen entfernt hat.

Das Analyseverfahren muß bestimmte Anforderungen erfüllen, um im Verfahren eingesetzt werden zu können. Das zum Entnahmevergong korrelierende Signal wird z. B. über ein

- 12 -

optisches Analysesystem ermittelt, das spezifische Molekül-eigenschaften in kleinen Volumenelementen von $< 10^{-14}$ l analysieren kann. Dies geschieht vorzugsweise durch Analysensysteme auf der Basis der konfokalen Laser-Korrelationsspektroskopie oder Fluoreszenzkorrelationsanalytik auf der Basis der Nahfeldspektroskopie, dessen Signal on line und Software-gesteuert zeitlich einen gezielten Entnahmevergang steuert. Gekoppelte Analyse- und Entnahmevergänge lassen sich erfindungsgemäß kaskadenförmig aneinanderreihen, wobei die aufgenommenen Probenvolumina mit oder ohne Verdünnungsschritt nachfolgend wiederum einer Analyse ausgesetzt werden und wiederum in angereicherter Form durch eine zweite und/oder weitere Entnahmeeinheit nach erfolgter Analyse entnommen werden.

Es lassen sich solche Bestandteile entnehmen, die mit mindestens einem Reaktionspartner einen Komplex bilden, der spektroskopisch erfaßt werden kann (indirekt) oder selbst hinreichende Fluoreszenzeigenschaften (direkt) aufweisen.

Von besonderem Interesse ist das Verfahren in Kombination mit der erfindungsgemäßen Vorgehensweise zur Entnahme noch nicht identifizierter (unbekannter) Pathogene. Ziel ist die Vermehrung eines isolierten Pathogens in vivo oder die Vermehrung des genetischen Materials des Pathogens oder Teilen davon in vitro durch Amplifikation der enthaltenen Nukleinsäure im Sinne eines Shot-Gun Verfahrens und Charakterisierung über Sequenzierung.

Bedeutsam ist auch die gezielte Entnahme von Bestandteilen, die bislang bezüglich ihrer molekularen Natur nicht bekannt sind, wie Moleküle, Zellen, Vesikel, Molekülkomplexe, die sich funktionell z. B. über eine enzymatische Wirkung oder eine Komplexbildung identifizieren lassen.

Wie in Figur 5 skizziert werden erfindungsgemäß unbekannte Partikel, wie Pathogene oder Immunogene, entnommen, indem

- 13 -

Seren von mindestens einem Organismus gewonnen werden, der mit dem nicht identifizierten Pathogen infiziert ist. Dabei wird mindestens ein Serum (Serum 1) aus der Phase einer akuten Infektion durch das bislang unbekannte Pathogen oder Immunogen gewonnen und mindestens ein weiteres Serum (Serum 2) aus demselben oder mindestens einem weiteren Organismus mit gleicher oder homologer Infektion aus der Phase der chronischen Infektion gewonnen. Das unbekannte Pathogen oder Immunogen aus Serum 1 wird mit mittelbar oder unmittelbar Fluoreszenz-Farbstoff-markierten Antikörpern aus Serum 2 zur Komplexbildung gebracht und der gebildete Komplex gemessen. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Kreuzkorrelation, wie in PCT/EP 94/00117 beschrieben, über die z.B. die gleichzeitige Bindung verschieden fluoreszierender Liganden wie Antikörper aus unterschiedlichen Organismen gemessen werden kann. Die Markierung von Antikörpern kann unmittelbar über mindestens eine Reaktion mit kopplungsfähigen Farbstoffen oder mittelbar durch Reaktion mit Farbstoff-markierten, Antikörper-Bindedomänen, insbesondere Protein A-Derivaten oder Protein G-Derivaten erfolgen. Die nicht identifizierten pathogenen Bestandteile können sich als an sich bekannte Mikroorganismen herausstellen. Als Merkmal werden spezifische Wechselwirkungen oder enzymatische Aktivitäten mit Fluoreszenz-markierten Zielmolekülen zu Oberflächen-exprimierten oder cytosolisch-exprimierten Struktur-elementen natürlicher oder genetisch rekombinierter Proteine oder Peptide detektiert.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann die Erfassung von Molekülen in sehr niedriger Konzentration bewirken. Zum Beispiel kann das Scanning von foetalen Zellen im mütterlichen Blut durchgeführt werden. Mit der erfindungsgemäßen Methode lassen sich sehr niedrige Konzentrationen ($< 10^{-12} M$) fluoreszierender Moleküle bestimmen. Das Verfahren kann jedoch unpraktikabel werden, wenn zu lange bei unveränderten Raumkoordinaten zur Festlegung eines oder mehrerer Meßvolumen gewartet werden muß, bis ein gesuchtes Molekül das Raum-

- 14 -

element des Meßvolumens passiert. Dieses Problem stellt sich auch bei höheren Konzentrationen ein ($> 10^{-12}$ M), wenn die Diffusionszeiten sehr klein sind, wie dies z.B. bei Zellen und zellgebundenen Molekülen der Fall ist. In solchen Fällen kann das erfindungsgemäße Verfahren so modifiziert werden, daß dem eigentlichen Meßverfahren ein Scanning-Prozeß vorgeschaltet ist, bei dem solange die Raumkoordinaten in zeitlich kontinuierlicher Meßtechnik oder zeitlich diskontinuierlicher Meßtechnik variiert werden, bis ein Signal der gewünschten Qualität erfaßt wird. Dies kann z. B. das gemeinsame Auftreten einer korrelierten Fluoreszenz mit zwei verschiedenen Emissionen bei Verwendung der Kreuzkorrelationsmethode sein. Ist ein Signal erfaßt, wird der FCS-Meßvorgang gestartet. Die Dauer eines Scanning-Vorgangs kann weniger als eine Millisekunde pro Meßvorgang betragen. Schon dann ist feststellbar, daß das "gescannte" Meßvolumen oder die parallel vermessenen Meßvolumina den gesuchten Bestandteil nicht beinhalten. Bei dieser Vorgehensweise ist zu beachten, daß die durchschnittlichen charakteristischen Diffusionszeiten in ihrer absoluten Größe auf berechenbare Weise beeinflußt werden. Dies geschieht zum Beispiel so, daß fixierte Moleküle (z.B. auf fixierten Bakterienzellen) direkt und ausschließlich die zeitliche Variation der relativen Veränderung der Raumkoordinaten des Meßvolumens im Vergleich zu den Koordinaten des Probevolumens wiedergeben, oder bei beweglichen kleinen Molekülen und sprunghafter Veränderung der Raumkoordinaten ca. die Hälfte der durchschnittlichen Aufenthaltsdauer, da die Moleküle sich bei Beginn des Meßvorgangs bereits innerhalb des Meßvolumens befinden.

Scanning-Prozesse, die der eigentlichen Messung vorgeschaltet sind, erlangen dann Bedeutung, wenn z. B. Zellpopulationen analysiert werden sollen, wobei nur ein Bruchteil der Zellen Moleküle oder Molekülkomplexe die die Entnahme bestimmenden Eigenschaften tragen. Dies ist z.B. bei der Analyse evolutiv hergestellter Mutantenpopulationen rekombinanter Zellen der Fall, aber auch bei der Analyse mütterlichen Blutes auf die

- 15 -

Anwesenheit kindlicher, kernhaltiger Erythrozyten, die auf bestimmte Erbanlagen oder Chromosomenanomalien analysiert werden sollen.

Das Verfahren eignet sich für eine Methode, die im folgenden als funktionale Genextraktion bezeichnet wird. Gemeint ist die Herstellung genetischer Sonden zur Auffindung/Detektion/-Klonierung spezifischer Funktionen, die auf einem Gesamtgenom oder in einer cDNA-Bank kodiert sind. Anwendungsbeispiele sind die funktionale Genomanalyse durch Verwendung von Phagen- oder Bakterien-Displaysystemen, sowie entsprechende Anwendungen in der evolutiven Biotechnologie. In beiden Beispielen geht es um die Detektion und gezielte Selektion von Zellen oder Phagen mit spezifischen Bindungseigenschaften zu bestimmten Liganden vor einem Hintergrund nicht-reagierender Phagen oder Bakterien.

Die Anzahl durchgemusterter Volumenelemente steigt somit erheblich. In Kombination mit der Kreuzkorrelation lassen sich somit im μ s- bis Nanosekundenbereich im Einzel und Multiarraybetrieb viele Volumenelemente durchmustern. Die Verschiebung wird nur unterbrochen, wenn sich im erfaßten Volumenelement z.B. verschiedenfarbige miteinander korrelierte Signale nachweisen lassen. Liegt diese Situation vor, können stoffliche Parameter der Bestandteile, z.B. die Translationsdiffusion, bestimmt werden. Diese Zeit ist um ein zu errechnendes Zeitelement (ca. 50%) statistisch kürzer, verglichen mit dem Fall, daß ein Teilchen in das Volumenelement von sich aus oder durch erzwungene Diffusion eindringen muß. Ist ein Teilchen einmal erfaßt, kann es auch durch Scanning der unmittelbaren Umgebung ein zweites Mal erfaßt werden.

Erfnungsgemäß kann das Meßvolumen sich aus parallel ausgeleuchteten Untermeßvolumina zusammensetzen, indem die gleichzeitige Ausleuchtung mehrerer Meßvolumina durch mindestens eine Strahlenquelle für elektromagnetische Strahlung durch

- 16 -

Verwendung mindestens eines holographischen Gitters zur Erzeugung mehrerer Volumenelemente erfolgt.

Die parallele Ausleuchtung mehrerer Volumenelemente mit konfokaler Optik ist in DE 40 35 799 beschrieben. Parallelle Ausleuchtung von Meßvolumina, deren relative Abstände im sub- μm -Bereich liegen, gelingt durch die beschriebenen Vorrichtungen nicht oder nur unbefriedigend. Die im erfindungsgemäßen Verfahren bereitzustellenden Ausleuchtungen mit einer Dimensionierung im unteren μm -Bereich und darunter gelingen durch Verwendung holographischer Gitter.

Umfangreiche Arrays kleiner Volumenelemente können durch Einsatz holographischer Gitter ausgeleuchtet werden. Die Meßvolumina werden erfindungsgemäß konfokal entweder über die Verwendung mehrerer Lochblenden in Objektebene, durch Positionierung von Multiarraydetektor-elementen in Objekt-ebene oder durch Einsatz von Lichtfaserbündeln mit Einkopplung des Lichtes in Objektebene und Übertragung auf Photonen-Detektoren auf Fluoreszenzeigenschaften darin enthaltener Moleküle vermessen.

Bei der hochparallelisierten Ausleuchtung von kleinen Volumenelementen stellt sich das Problem der Registrierung der emittierten Fluoreszenzsignale aus den einzelnen Volumenelementen. In der Patentanmeldung PCT/EP 94/00117 ist beschrieben, daß es möglich ist, parallel kleine Raumelemente auszuleuchten und die jeweiligen Fluoreszenzsignale individuell durch die Verwendung konfokaler Lochblendensysteme in Objektebene auf Multiarraydetektoren abzubilden oder die Signale an der Position und anstelle der Lochblenden in Lichtleiter einzukoppeln und auf Detektorelemente zu leiten oder die Multiarraydetektoren anstelle und in der Position der der Lochblenden selbst zu positionieren. Es wird auch die Möglichkeit beschrieben, ein größeres Volumenelement auszuleuchten und mit den oben beschriebenen konfokalen,

- 17 -

parallelen Abbildungen kleiner Untervolumenelemente zu kombinieren.

Bei hoher Parallelisierung werden jedoch die Anforderungen an die Anzahl der Detektorarrays sowie an den mit der parallelen Verarbeitung auflaufenden Daten verbundenen Rechenaufwand erheblich. Erfindungsgemäß werden diese Probleme dadurch gelöst, daß in einer weiteren Form der Kopplung kleiner, parallel ausgeleuchteter Raumelemente mit einer Registriervorrichtung die Signale über mehrere Raumelemente hinweg integriert erfaßt werden. Diese Vorgehensweise ist insbesondere bei solchen Anwendungen von Nutzen, bei denen

- eine Vielzahl von Volumenelementen durchgemustert werden sollen,
- der Rechenaufwand zugunsten der eingesetzten Rechenkapazität und der Rechendauer minimiert werden soll,
- die Anzahl der pro Messung erfaßten Volumenelemente und somit das vermessene Gesamtvolumen maximiert werden soll,
- Signale von Molekülen, Molekülkomplexen oder Zellen in hoher Verdünnung analysiert werden sollen,
- die Präzision der ortsaufgelösten Erfassung von untergeordneter Bedeutung ist,
- die Anzahl der ausgesandten Lichtquanten während der Diffusion durch ein einzelnes Raumelement für eine Korrelation ausreichend ist.

Erfindungsgemäß werden mindestens zwei Meßvolumina bei der Signalregistrierung in Objektebene gemeinsam oder in Gruppen zusammengefaßt auf mindestens ein Detektorelement eines photonenregistrierenden Meßsystems konfokal abgebildet.

Zur Erfassung fluoreszierender Moleküle in sehr niedriger Konzentration wird das Probevolumen erfindungsgemäß vor der eigentlichen Messung und Entnahme mindestens eines Bestand-

- 18 -

teiles einem Scanning-Prozeß unterworfen, wobei durch kontinuierliche oder diskontinuierliche zeitliche Variation der Raumkoordinaten des Meßvolumens, relativ zu den Raumkoordinaten des Probevolumens, die Zeit zur Erfassung eines gesuchten Teilchens verkürzt wird. Das Zeitintervall δt für die Messung eines oder mehrerer Volumenelemente mit definierten Raumkoordinaten vor einer Erfassung eines gesuchten Moleküls über sein Fluoreszenz-Meßsignals ist dabei kürzer als die durchschnittliche Aufenthaltsdauer des gesuchten Moleküls innerhalb eines Meßvolumens.

Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, daß eine Pore einer porösen Aufnahmeverrichtung dicht an das optische Meßvolumen herangeführt wird und die Aufnahmeverrichtung mit einer mechanisch, optisch oder elektrisch steuerbaren Entnahmeverrichtung verbunden ist. Sie umfaßt die Anordnung eines geschlossenen oder offenen Behältnisses zur Aufnahme eines Probevolumens, gekoppelt mit einer Meßvorrichtung zur Ausleuchtung und/oder Messung eines kleinen Volumenelementes (Meßvolumen) durch elektromagnetische Strahlung und mindestens einer Verbindung zu mindestens einem zweiten Volumenelement in einer Aufnahmeverrichtung, das mit dem Probevolumen durch eine Öffnung in direktem Kontakt über eine flüssige Phase steht, wobei die Öffnung dem Meßvolumen vorzugsweise räumlich unmittelbar benachbart ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren findet besondere Verwendung zur präparativen Gewinnung unbekannter Pathogene, Immunogene oder Organismen, die Teile eines Genoms funktional exprimieren, sowie zur Analyse und präparativen Gewinnung kernhaltiger foetaler Zellen aus mütterlichem Blut.

Derartige Probleme stehen im Zusammenhang mit Verfahren zur evolutiven Optimierung von Peptiden und/oder Proteinen durch Einsatz von Mutagenese-Verfahren und Selektions-Verfahren, wie sie beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung

- 19 -

PCT/EP 94/00117 vorgeschlagen werden. Es lassen sich ca. 10^9 Bakterien in ihren Bindungseigenschaften zu spezifischen Farbstoff-markierten Substanzen innerhalb von 24 Stunden durchmustern z.B. auf die Anwesenheit eines Bakteriums, das ein Oberflächenprotein/Peptid exprimiert, das die Fähigkeit besitzt, mit dem Zielmolekül von vorgegebener Konzentration in Wechselwirkung zu treten. Das entsprechende Bakterium ist aus einem solchen Reaktionsansatz mit herkömmlichen Methoden klonierbar bzw. mit dem erfindungsgemäßen Verfahren direkt isolierbar.

Ein weiteres bedeutendes Anwendungsfeld ergibt sich aus dem sogenannten Genomprojekt zur funktionalen Kartierung von Gensegmenten aus genomischen Banken, cDNA Banken oder Banken subgenischer Strukturelemente (Shape Space). Auf diese Weise lassen sich genomische und/oder subgenomische Segmente aus umfangreichen Kollektiven in ihrer Funktion, z.B. ihrem funktionalen Bindeverhalten zu Zielmolekülen bestimmen.

Die Verwendung der beschriebenen Methodik der funktionalen Zuordnung genetisch kodierter Peptidsegmente kann insbesondere in der allergologischen Forschung große Bedeutung erlangen. Die Zuordnung von immundominanten Epitopen auf Allergenen (z.B. Aspergillus, Milchprotein, alpha-Amylase) ist von außerordentlich großer Bedeutung und bislang ein schwer zu lösendes Problem. Typische Probleme der Praxis sind:

- Bestimmung der IgE-bindenden Moleküle aus einem zumeist undefinierten Substanzgemisch. Bedeutsam ist beispielsweise die Beantwortung der Frage, welche Bestandteile des Sojalecithins immunogen sind, die Reinsubstanz allein, die Reinsubstanz in ihrer Wechselwirkung mit Verunreinigungen des Präparates oder die Wechselwirkung mit Strukturen des Empfängerorganismus. Erfindungsgemäß lassen sich die unterschiedlichen immunogenen Sub-

- 20 -

stanzen in der Mischung mit markiertem IgE aus Patienten differenzieren.

- Durch Expression subgenischer Gensegmente lassen sich
 - mit dem oben genannten Verfahren die immun-dominanten Epitope eingrenzen, charakterisieren und präparativ darstellen. Mit diesen Ergebnissen lassen sich
- mit den in DE 41 12 440 C2 beschriebenen Methoden evolutiv analoge, funktionale Moleküle erzeugen, denen die entsprechenden Immundominanten Regionen fehlen, z.B. eine abgeschwächte immunogene alpha--Amylase oder Waschmittel-Proteasen,
- die spezifischen Epitope nach Standardmethoden einfach gentechnisch darstellen und als reine Nachweis-reagenzien einsetzen oder zur Desensibilisierung verwenden.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren lassen sich bestimmte Aufgaben lösen, die bislang nicht oder nur durch unverhältnismäßig großen Aufwand lösbar gewesen sind.

- Screening von pharmakologisch aktiven Substanzen über die Bindung bekannter Fluoreszenz-markierter Liganden an an sich unbekannte Rezeptoren, die sich auf Zellen oder natürlichen oder künstlichen Vesikel-Strukturen befinden können.

Es gibt natürliche und chemisch synthetisierte Wirkstoffe mit pharmakologischer Wirksamkeit, deren Zielmoleküle nicht bekannt sind. Die Zielmoleküle können dabei extrazelluläre Moleküle sein (z.B. Protease-Hemmer), Oberflächen-Membran-Rezeptoren (z.B. Insulin), lösliche Rezeptoren als Mediatoren (steroidhormonbindende Rezeptoren) oder zelluläre lösliche Strukturproteine oder Enzyme.

- 21 -

Erfindungsgemäß lässt sich somit die äußerst wichtige Aufgabe lösen, zu einem bekannten Wirkstoff das pharmakologisch wichtige Zielmolekül zu finden, zu charakterisieren und gegebenenfalls zu präparieren:

- Orphan-Rezeptor-Suche
- Aufklärung pharmakologischer Wirkmechanismen
- Suche nach analogen Wirkstoffen
- Suche und Differenzierung unterschiedlicher Rezeptormoleküle, vorzugsweise in differenzierbaren biologischen Targets (unterschiedliche Zelldifferenzierung, Tumor/non-Tumor), krankheitsassoziiert - nicht krankheitsassoziiert etc.

Legende der Figuren

Figur 1

(Molekülsammler)

Die schematische Zeichnung beschreibt das Prinzip der Vorrichtung, bei der durch eine Pore, die die offene Verbindung zwischen den Kompartimenten A und B darstellt, durch einen Druck- oder Unterdruckpuls oder einen elektrischen Puls die Inhaltsstoffe aus einem kleinen Volumenelement aus dem Kompartiment A in ein Kompartiment B überführt werden kann. Ein Teil dieses Volumenelementes ist das dunkel symbolisierte Meßvolumen von $< 10^{-14}$ l unmittelbar vor der Pore, in dem die FCS-Analyse stattfindet. Eine Zelle oder ein makromolekularer Komplex lässt sich auch durch einen entsprechend gerichteten Lichtdruck mittels eines Laserpulses erreichen, der senkrecht zum Parendurchmesser erfolgt und zum Transport eines als gewünscht erkannten Komplexes in die Aufnahmeverrichtung des Kompartiment B geführt werden kann.

- 22 -

Figur 2

(FCS-Selektion einzelner Mikroorganismen mit gezielter Fraktionierung)

Die Figur zeigt die erfindungsgemäße FCS-Selektion einzelner Mikroorganismen mit gezielter Fraktionierung aus einem kontinuierlich oder diskontinuierlich bewegten Probevolumen. Das FCS-Meßvolumen befindet sich unmittelbar vor der Öffnung einer kapillaren Pore und ist durch die schraffierte Säule im Fokussierungskegel der FCS-Laserausleuchtung oder Nahfeldausleuchtung gekennzeichnet. Jeweils in kosekutiven Schritten lassen sich rechnergesteuert als positiv identifizierte Meßvolumina gemeinsam mit einem umgebenden Volumen aus der Probevorrichtung in die Aufnahmeverrichtung transportieren. Dies gelingt z. B. durch Anschluß einer Microdrop-Dispenser-Vorrichtung oder z.B. in einfacher Ausführung durch Ankopplung einer schrittmotorgesteuerten Spritze (nl-Aufnahme/Schritt) oder einen elektrischen Puls. So können während einer Messung mehrere Volumenelemente in der Aufnahmeverrichtung akkumuliert werden.

Figur 3

(Kaskadenanreicherung)

Durch serielles Aneinanderschalten von Trennvorrichtungen, wie sie in Figur 2 beschrieben sind, läßt sich die Trennleistung steigern. Dies ist beispielsweise bedeutsam, wenn aus einem hochkomplexen Gemisch (10^{12} Partikel) von z. B. rekombinaten Bakterien oder Phagen in hoher Konzentration einzelne Partikel möglichst hintergrundsfrei ausgesondert werden sollen.

Figur 4

(FCS-Selektion einzelner Mikroorganismen)

- 23 -

Die Abbildung beschreibt eine Vorrichtung, mit der Bakterien aus Gemischen ausgesondert werden können, die bestimmte, durch FCS zu messende Eigenschaften exprimieren. Es wird einem kapillaren Fließsystem ein zunächst nicht induziertes Bakteriengemisch zugeführt. In einer Mischkammer wird beispielsweise IPTG als ein expressionsinduzierendes Reagenz zugeführt. Nach hinreichend langer Flußzeit wird dem Expressionsprodukt ein Assay-System mit Marker molekülen zugeführt, die sich anschließend an einer definierten Position in ihrer Wechselwirkung mit einem etwaigen Expressionsprodukt messen lassen. Die Abbildung soll darüber hinaus andeuten, daß ein positiv identifiziertes Meßvolumen auch an einer räumlich und zeitlich entfernten Position abgenommen werden kann, sofern die Raum/Zeit-Koordinaten in einem bekannten und definierten Verhältnis zueinander stehen.

Figur 5

(Nachweis und Präparation neuer Pathogene)

Die Abbildung demonstriert die erfindungsgemäße Vorgehensweise bei der Selektion von unbekannten Pathogenen, die sich durch Kreuzkorrelation mittels FCS detektieren lassen, wobei die unterschiedlich markierten Antikörper, die gegen ein bestimmtes Pathogen gerichtet sind, vorzugsweise aus unterschiedlichen Patienten stammen können.

A n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Entnahme von einem oder wenigen Bestandteilen eines Systems wie Moleküle, Molekülkomplexe, Vesikel, Micellen, Zellen, gegebenenfalls mit einem dazugehörigen Volumenelement (Entnahmeverolumen). $V, 10^{-9} \geq V \geq 10^{-18}$ l, aus einem größeren Volumen einer die zu entnehmenden kleinen Bestandteile enthaltenen Umgebung (Probervolumen) durch Transfer des Bestandteiles oder der Bestandteile in eine andere Umgebung, wobei Ort und Zeit der Entnahme durch ein mit dem zu entnehmenden kleinen Bestandteil korrelierendes Signal festgelegt wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Probervolumen mit der anderen Umgebung in Form einer Aufnahmeverrichtung durch eine Pore einer Kapillare oder Membranwandung verbunden ist, deren engste Öffnung D durch $100 \mu\text{m} \leq D \leq 0,1 \mu\text{m}$ gegeben ist.
3. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 und/oder, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Entnahme in ein oder mehreren Schritten in ein und dieselbe Aufnahmeverrichtung erfolgt, wobei die einzelnen Entnahmevergänge jeweils unabhängig voneinander nach Art eines Sammelvorganges erfolgen.
4. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Entnahme über einen gerichteten Transport des Volumenelementes durch mindestens einen elektrischen Spannungs- oder Feldimpuls erfolgt und/oder mechanisch durch mindestens einen Druckdifferenzpuls und/oder durch mindestens einen Lichtdruckpuls.

- 25 -

5. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 2 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Aufnahmeverrichtung eine Kapillare ist, deren Lumen größer ist als der Durchmesser der Pore oder Kapillarenspitze, deren Öffnung mit dem Probevolumen in direktem Kontakt steht.
6. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 5 dadurch gekennzeichnet, daß die Entnahme gezielt über einen elektrischen Feldimpuls über das mindestens einmalige, kurzzeitige Anlegen eines elektrischen Feldes zum Zweck einer Elektrophorese elektrisch geladener Bestandteile und/oder zum Zweck einer Elektroosmose mit gekoppeltem Transport elektrisch neutraler Moleküle erfolgt, indem eine Elektrode mit der Lösung auf Seiten des Probevolumens elektrisch leitend in Kontakt steht und die andere Elektrode auf Seiten der Aufnahmeverrichtung elektrisch leitend in Kontakt steht mit der Lösung und der leitende Kontakt zwischen beiden Kompartimenten über die Pore hergestellt wird.
7. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Entnahme gezielt über einen mechanischen Druckimpuls durch mindestens einmalige kurzzeitige Erhöhung des Drückes im Volumen außerhalb des Aufnahmekompartimentes im Vergleich zum Druck innerhalb des Aufnahmekompartimentes entsteht und/oder durch eine kurzzeitige Druckminderung innerhalb des Aufnahmekompartimentes.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7 dadurch gekennzeichnet, daß der Unterdruckpuls durch ein piezo-gesteuertes Dispensiermodul entsteht, dessen Füllvolumen sich innerhalb des Aufnahmekompartimentes befindet und/oder daß der Druckpuls und/oder Unterdruckpuls dadurch erfolgt, daß durch vorzugsweise Schrittmotor gesteuerte Hubänderung einer gekoppelten Kolbenspritzenvorrichtung

- 26 -

das Volumen der Aufnahmeverrichtung vergrößert wird oder das Probevolumen zugunsten der Aufnahmeverrichtung verkleinert wird.

9. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 6 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Größe des aufgenommenen Volumens über die Anzahl der dispensierten Tropfen oder der Schritte des Schrittmotors gesteuert wird.
10. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 9, dadurch gekennzeichnet, daß das korrelierende Signal den Entnahmzeitpunkt triggert, der in dem Moment erfolgt, wenn sich das oder die zu entnehmende Partikel mit hoher Wahrscheinlichkeit innerhalb des Entnahmeverolumens befindet.
11. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 2 - 10 dadurch gekennzeichnet, daß die zeitliche und/oder ortsspezifische Korrelation zwischen einer Analyse eines Subvolumens des Probevolumens (Meßvolumen) innerhalb des Volumenelementes V und einer Entnahme eines gewünschten Bestandteiles durch Entnahme des Volumenelementes V Rechner/Software-gestützt vorgenommen wird, wobei sich mindestens ein Bestandteil, das im Volumenelement V analysiert wurde, beim Entnahmevergang im aufgenommenen Volumenelement V befindet, wobei die Pore der Aufnahmeverrichtung mechanisch an das Volumenelement herangeführt wird und/oder das Volumenelement V oder Bestandteile davon mit vorbestimmter zeitlicher Korrelation über einen Transport im Fluß oder über elektrostatische oder magnetische Feldgradienten oder Bestandteile davon an die Pore des Aufnahmekompartimentes zeitlich korreliert transportiert wird und/oder die Analyse geometrisch unmittelbar vor der Pore des Aufnahmekompartimentes erfolgt.

- 27 -

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Subvolumen (Meßvolumen) kleiner als das Volumenelement V ist.
13. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 12, dadurch gekennzeichnet, daß das korrelierende Signal über ein optisches Analysesystem ermittelt wird, das spezifische Moleküleigenschaften in kleinen Volumenelementen von $< 10^{-14}$ l analysieren kann, insbesondere Analysensysteme auf der Basis der konfokalen Laser-Korrelationsspektroskopie oder auf der Basis der Nahfeldspektroskopie, dessen Signal on line und Software gesteuert zeitlich einen gezielten Entnahmevergäng steuert.
14. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 13, dadurch gekennzeichnet, daß die gekoppelten Analyse- und Entnahmevergänge kaskadenförmig aneinander gereiht werden, wobei die aufgenommenen Probenvolumina mit oder ohne Verdünnungsschritt nachfolgend wiederum einer Analyse ausgesetzt werden und wiederum in angereicherter Form durch eine zweite und/oder weitere Entnahmeeinheit nach erfolgter Analyse entnommen werden können.
15. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 14, dadurch gekennzeichnet, daß Bestandteile entnommen werden, die mit mindestens einem Reagens einen Komplex bilden, der spektroskopisch erfaßt werden kann.
16. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 15, dadurch gekennzeichnet, daß Bestandteile entnommen werden, die bislang nicht bezüglich ihrer molekularen Natur bekannt sind, Moleküle, Zellen, Vesikel, Molekülkomplexe, die sich über eine Wechselwirkung mit bekannten Strukturen oder Wirkungen wie enzymatische Wirkung oder eine Komplexbildung identifizieren lassen.

- 28 -

17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die unbekannten Partikel Pathogene oder Immunogene sind, die gezielt entnommen werden, indem Seren von mindestens einem Organismus gewonnen werden, wobei mindestens ein Serum (Serum 1), aus der Phase einer akuten Infektion durch ein auch bislang nicht identifiziertes (unbekanntes) Pathogen oder Immunogen gewonnen wird und mindestens ein Serum (Serum 2) aus demselben oder mindestens einem weiteren Organismus mit gleicher oder homologer Infektion aus der Phase der chronischen Infektion gewonnen wird, wobei das auch unbekannte Pathogen oder Immunogen aus Serum 1 mit mittelbar oder unmittelbar fluoreszenz-markierten Antikörpern aus Serum 2 zur meßbaren Komplexbildung gebracht wird.
18. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 16 - 17 dadurch gekennzeichnet, daß über Kreuzkorrelation die gleichzeitige Bindung von Liganden mit unterschiedlichen Fluoreszenzsignalen, z. B. markierte Antikörper aus unterschiedlichen Organismen, bestimmt wird.
19. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 16 - 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung der Antikörper unmittelbar über mindestens eine Reaktion mit kopplungsfähigen Farbstoffen oder mittelbar durch Reaktion mit Farbstoff-markierten, Antikörper-Bindedomänen, insbesondere Protein A-Derivaten oder Protein G-Derivaten erfolgt.
20. Verfahren gemäß mindestens einen der Ansprüche 1 - 19 dadurch gekennzeichnet, daß die auch unbekannten Partikel an sich bekannte Mikroorganismen, oder Vesikel sind, wobei als Merkmal spezifische Wechselwirkungen oder enzymatische Aktivitäten mit fluoreszenz-markierten Zielmolekülen zu oberflächen-exprimierten oder cytosolisch-exprimierten Strukturelementen natürlicher

- 29 -

oder genetisch rekombinierter Proteine oder Peptide detektiert werden.

21. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Meßvolumen sich aus parallel ausgeleuchteten Untermeßvolumina zusammensetzt, wobei die gleichzeitige Ausleuchtung mehrerer Meßvolumina durch mindestens eine Strahlenquelle für elektromagnetische Strahlung durch Verwendung mindestens eines holographischen Gitters erfolgt.
22. Verfahren gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Registrierung von Fluoreszenzsignalen aus mindestens einem Meßvolumen durch konfokale Abbildung durch Verwendung einer Mehrzahl konfokaler Lochblenden in Objektebene oder Einkopplung der Signale in Lichtleiter in der Objektebene oder durch Multiarraydetektoren in Objektebene erfolgt.
23. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 21 - 22, dadurch gekennzeichnet, daß zur Durchführung parallelisierter Messungen an mindestens zwei Meßvolumina bei der Signalregistrierung in Objektebene mindestens zwei Meßvolumina gemeinsam oder in Gruppen zusammengefaßt auf mindestens ein Detektorelement eines Photonenregistrierenden Meßsystems konfokal abgebildet werden.
24. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 23, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erfassung fluoreszierender Moleküle in sehr niedriger Konzentration das Probevolumen vor der eigentlichen Messung und Entnahme mindestens eines Bestandteiles einem Scanning-Prozeß unterworfen wird, wobei die Zeit zur Erfassung eines gesuchten Teilchens verkürzt wird, indem die Raumkoordinaten des Meßvolumens relativ zu den Raumkoordinaten des Probevolumens zeitlich diskontinuierlich oder kontinuierlich variiert werden.

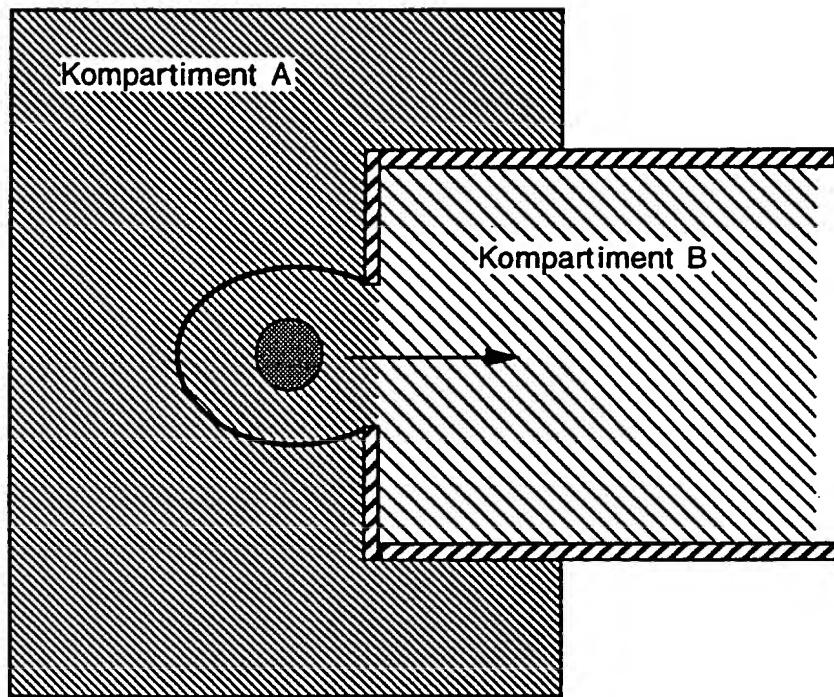
- 30 -

25. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Zeitintervall δt für die Messung eines oder mehrerer Volumenelemente mit definierten Raumkoordinaten vor einer Erfassung eines gesuchten Moleküls über sein Fluoreszenz-Meßsignal kürzer ist als die durchschnittliche Aufenthaltsdauer des gesuchten Moleküls innerhalb eines Meßvolumens.
26. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 2 - 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Pore einer Aufnahmeverrichtung dicht an das Meßvolumen herangeführt wird, die Aufnahmeverrichtung mit einer mechanisch, optisch oder elektrisch steuerbaren Entnahmeverrichtung verbunden ist.
27. Vorrichtung gemäß Anspruch 26, bestehend aus einer Anordnung eines geschlossenen oder offenen Behältnisses zur Aufnahme eines Probevolumens, gekoppelt mit einer Meßvorrichtung zur Ausleuchtung und/oder Messung eines kleinen Volumenelementes (Meßvolumen) durch elektromagnetische Strahlung und mindestens einer Verbindung zu mindestens einem zweiten Volumenelement, das mit dem Probevolumen durch eine Öffnung in direktem Kontakt über eine flüssige Phase steht, wobei die Öffnung dem Meßvolumen vorzugsweise räumlich unmittelbar benachbart ist.
28. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 27, zur präparativen Gewinnung nicht identifizierter Pathogene, Immunogene oder Organismen, die Teile eines Genoms funktional exprimieren.
29. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 25 zur Herstellung genetischer Sonden zur Auffindung/Detektion/Klonierung funktionalen Elementen eines Gesamtgenoms und/oder davon abgeleiteter Diagnostika und/oder Therapeutika.

- 31 -

30. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 25, zur Analyse und präparativen Gewinnung kernhaltiger foetaler Zellen aus mütterlichem Blut.
31. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 25, zur Detektion und präparativen Gewinnung mindestens eines spezifischen Gens eines Mikroorganismus, dessen mindestens ein Genprodukt auf der inneren oder äußeren Zellmembran oder Virushülle präsentiert ist.
32. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 25, zur Funktionsbestimmung von Genprodukten definierter Gensegmente.

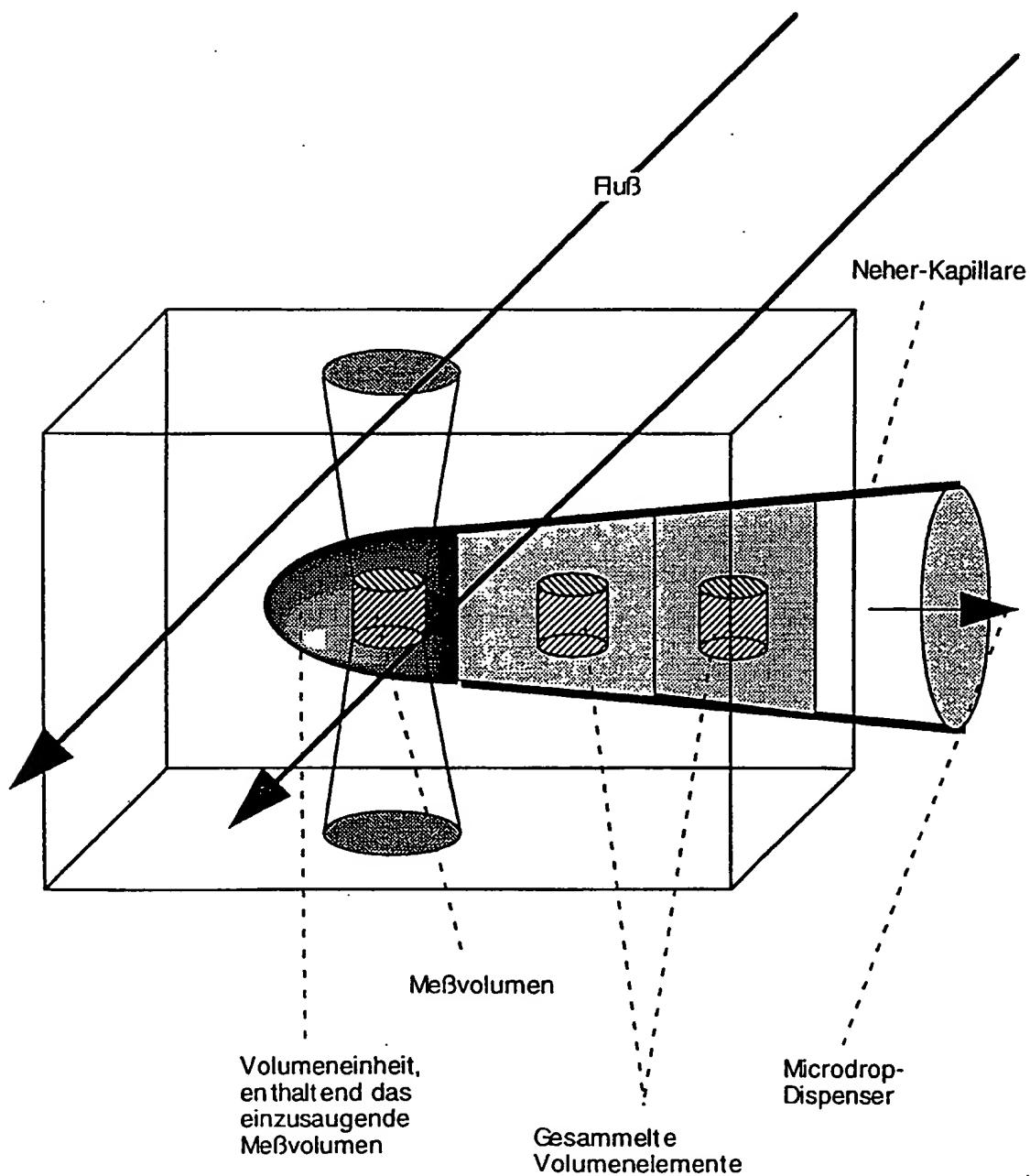
1 / 5



FIGUR 1

2 / 5

FCS-Selection einzelner Mikroorganismen mit gezielter Fraktionierung (FCS-Molekül-Sortierung)

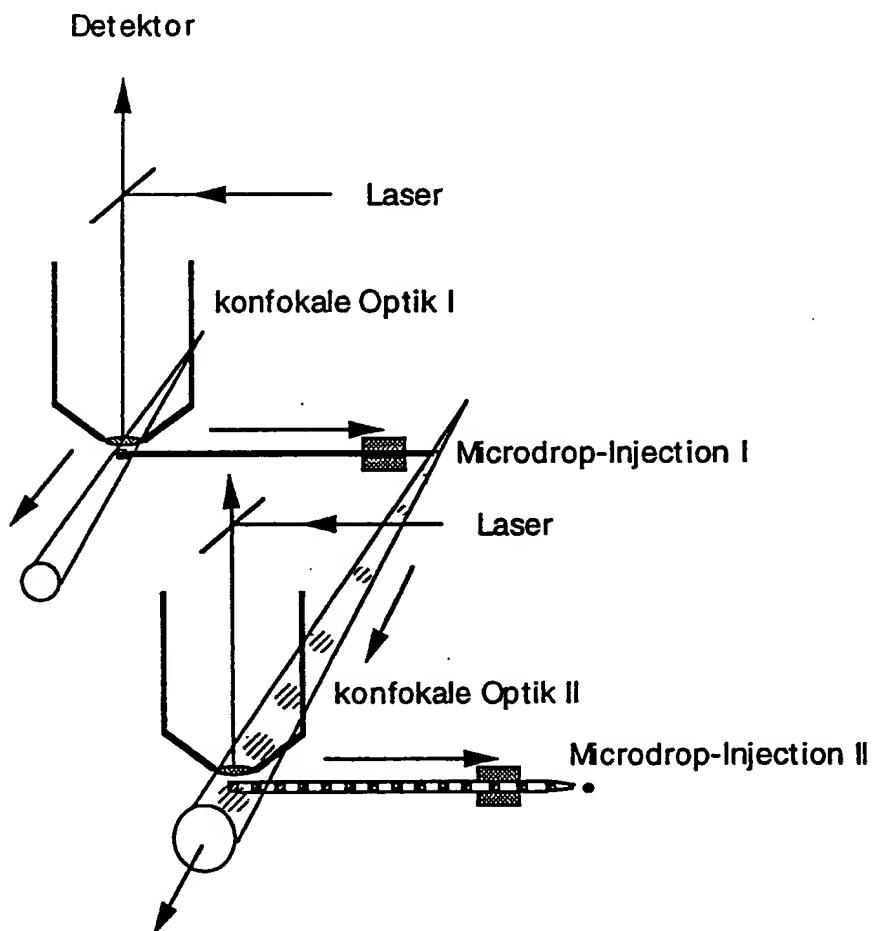


FIGUR 2

ERSATZBLATT (REGEI 26)

3 / 5

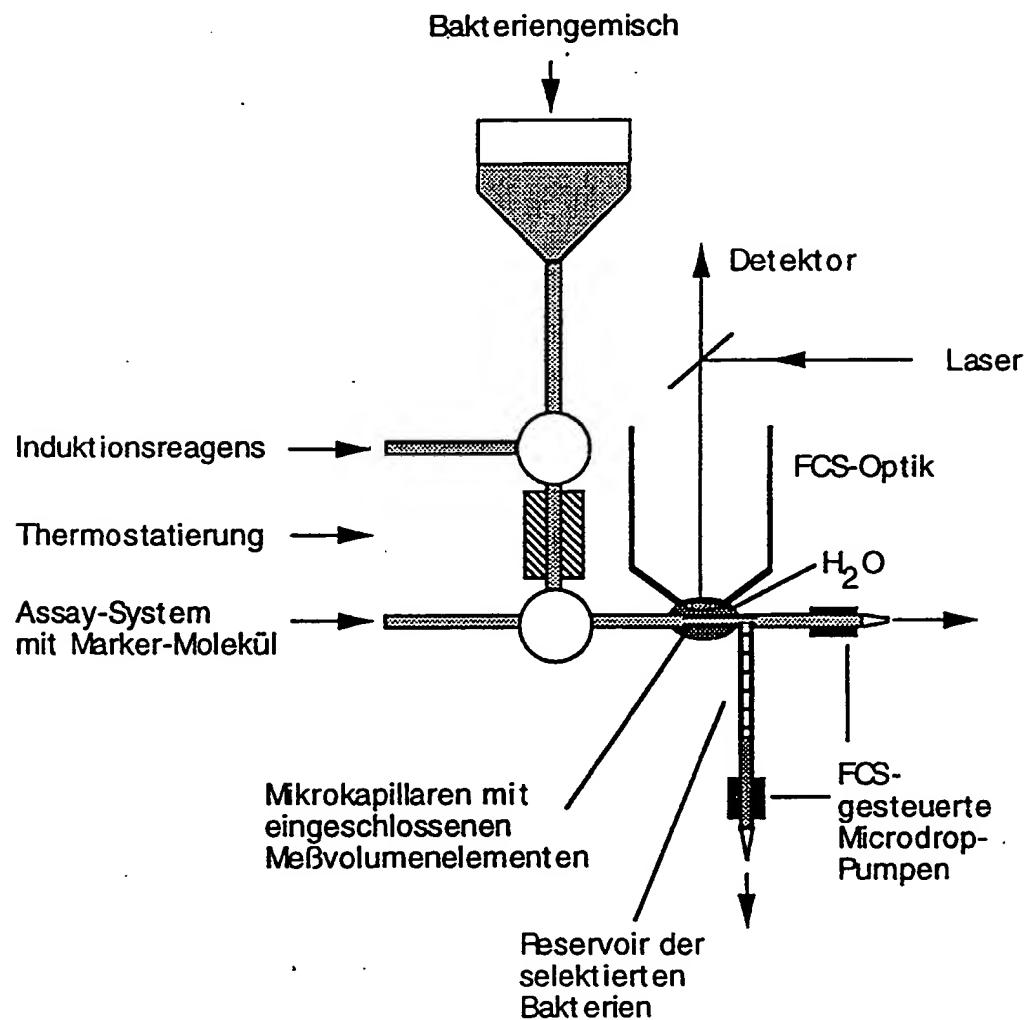
Kaskadenanreicherung von FCS- charakterisierten Molekülen, Molekülkomplexen oder Zellen



FIGUR 3

4 / 5

FCS-Selection einzelner Mikroorganismen mit gezielter Fraktionierung



FIGUR 4

ERSATZBLATT (REGEL 26)

5 / 5

